

2/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011261369

WPI Acc No: 1997-239272/199722

Cell-adhering material, useful for diagnosing auto-immune disease and genetic disorders - has LFA-3 deriv protein contg no D2 or TM regions, immobilised on carrier.

Patent Assignee: KANEBUCHI KAGAKU KOGYO KK (KANF)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 9075090	A	19970325	JP 95262271	A	19950913	199722 B

Priority Applications (No Type Date): JP 95262271 A 19950913

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 9075090	A		18	C12N-015/09	

Abstract (Basic): JP 9075090 A /

Cell-adhering material in which LFA-3 deriv protein which has no D2 region nor TM region and partially has cytoplasmic region and has only one cysteine residue at the carboxyl terminal is immobilised on a carrier pref through thiol gp of protein. Also claimed is method for adhering and sepg CD2 positive cell or leucocyte by using the above cell adhering material.

ADVANTAGE - Used for treatment of auto-immune diseases and genetic diagnosis.

In an example, 37 g 2-bromoacetamide was suspended in 75 ml water. 20 ml 37% HCHO and 2.5 g C2CO3 were added and mixt was stirred at room temp. Soln was left to stand at 4 deg C overnight and supernatant was discarded. 50 ml water was added and left to stand at 4 deg C overnight. Procedure was repeated and formed ppte was recovered by filtration and dried and freeze-dried to give active halogen cpd, N-hydroxymethyl-2-bromoacetamide. Polystyrene plate was treated with cpd. LFA-3 deriv protein was immobilised on polystyrene plate. CD2 positive cell was adhered on LFA-3 deriv protein-immobilised polystyrene plate. Polystyrene beads were also treated with cpd. LFA-3 deriv protein was immobilised on polystyrene beads. Leucocytes were adhered on the LFA-3 deriv protein-immobilised polystyrene beads.

Dwg.0/3

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): B01D-015/08; B01J-020/26;

C07K-014/705; C12M-001/00; C12N-005/06

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-75090

(43)公開日 平成9年(1997)3月25日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
B 0 1 J 20/26			B 0 1 J 20/26	H
C 0 7 K 14/705			C 0 7 K 14/705	
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 5/06			B 0 1 D 15/08	

審査請求 未請求 請求項の数17 F D (全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-262271

(22)出願日 平成7年(1995)9月13日

(71)出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72)発明者 大原 高秋

兵庫県明石市魚住町西岡1862 カーネギー
301

(72)発明者 岡▲さき▼ 武士

兵庫県加古川市加古川町備後178-1

(72)発明者 角谷 徹

兵庫県加古川市別府町新野辺90-43

(74)代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外1名)

(54)【発明の名称】 細胞付着部材

(57)【要約】

【課題】 C D 2陽性細胞、好ましくは白血球、より好ましくはT細胞、ならびにそれらのDNAおよびRNAを吸着、分離および回収することにより、自己免疫疾患、輸血後の副作用防止、T細胞ワクチン療法および遺伝子診断を可能にする、新規な細胞接着タンパク質の誘導体を担体に固定化した細胞付着部材を提供する。

【解決手段】 C D 2陽性細胞、好ましくは白血球、より好ましくはT細胞、ならびにそれらのDNAおよびRNAの吸着分離を行ないうる、D 2領域およびTM領域をもたず細胞質内領域を部分的にもつカルボキシル末端に唯一のシステイン残基を有するL F A-3誘導体タンパク質を担体に固定化した細胞付着部材。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 D2領域およびTM領域をもたず細胞質内領域を部分的にもつカルボキシル末端に唯一のシステイン残基を有するLFA-3誘導体タンパク質を担体に固定化した細胞付着部材。

【請求項2】 D2領域およびTM領域をもたず細胞質内領域を部分的にもつカルボキシル末端に唯一のシステイン残基を有するLFA-3誘導体タンパク質のチオール基を介して該タンパク質を担体に固定化した細胞付着部材。

【請求項3】 該LFA-3誘導体タンパク質がヒツジに由来する請求項1記載の細胞付着部材。

【請求項4】 該LFA-3誘導体タンパク質がヒトに由来する請求項1記載の細胞付着部材。

【請求項5】 該LFA-3誘導体タンパク質が、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなる、ヒツジ由来のタンパク質である請求項1記載の細胞付着部材。

【請求項6】 該LFA-3誘導体タンパク質が、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる、ヒト由来のタンパク質である請求項1記載の細胞付着部材。

【請求項7】 該LFA-3誘導体タンパク質がヒツジに由来する請求項2記載の細胞付着部材。

【請求項8】 該LFA-3誘導体タンパク質がヒトに由来する請求項2記載の細胞付着部材。

【請求項9】 該LFA-3誘導体タンパク質が、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなる、ヒツジ由来のタンパク質である請求項2記載の細胞付着部材。

【請求項10】 該LFA-3誘導体タンパク質が、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる、ヒト由来のタンパク質である請求項2記載の細胞付着部材。

【請求項11】 白血球を除去しうる請求項1ないし10のいずれかに記載の細胞付着部材。

【請求項12】 T細胞を分離回収しうる請求項1ないし10のいずれかに記載の細胞付着部材。

【請求項13】 白血球からのDNAあるいはRNAの分離を可能とする請求項1ないし10のいずれかに記載の細胞付着部材。

【請求項14】 請求項1ないし10のいずれかに記載の細胞付着部材を用いてCD2陽性細胞を付着分離する方法。

【請求項15】 該細胞付着部材とCD2陽性細胞を含む体液を接触させる請求項14記載の方法。

【請求項16】 請求項1ないし10のいずれかに記載の細胞付着部材を用いて白血球を付着分離する方法。

【請求項17】 該細胞付着部材と白血球を含む体液を接触させる請求項16記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な、細胞付着タンパク質の誘導体を担体に固定化した細胞付着部材お

よびそれを用いてCD2陽性細胞を付着分離する方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、遺伝子工学を用いた生産による、該誘導体を担体に固定した細胞付着部材、該細胞付着部材を用いてCD2陽性細胞、とくに白血球を付着分離する方法、白血球を除去しうる該細胞付着部材、T細胞を分離回収しうる細胞付着部材および白血球からのDNAあるいはRNAの分離を可能とする該細胞付着部材に関する。

【0002】

【従来の技術】従来の白血球を分離する技術には、遠心分離を用いた血球分離装置を用いる方法やコットンおよびポリエステル繊維のフィルターがある。T細胞を分離する技術には、T細胞の表面抗原であるCD3、CD4あるいはCD8に対する抗体を担体に固定化したビーズを充填したカラムやプレートがある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来の遠心分離を用いた血球分離装置を用いる方法は、たとえば血球分離装置としてIBM2997を用いたばあい、体外循環した血液を遠心して比重の違いから血球成分の分離層が形成される。ここで操作ダイヤルを調節して、赤血球や血小板は排出せずに体内に戻すことになるが、装置が複雑なために本操作はかなり習熟しないと必要な成分まで除去されてしまうことになるという問題点を有している。コットンおよびポリエステル繊維のフィルターにより白血球を付着分離するばあいは、施行にあたり、抗凝固剤として、メシル酸ナファモスタットまたはクエン酸を使用し、ヘパリンは使用できないという問題点と、原理的に非特異的付着であるという問題点および血小板の付着量が多いという問題点がある。

【0004】T細胞の表面抗原であるCD3、CD4あるいはCD8に対する抗体を担体に固定化したビーズを充填したカラムやプレートは、末梢血から直接T細胞を分離できないか、あるいは、非常に回収率が低いという問題点がある。

【0005】本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、今までに知られていない、新規な、細胞付着タンパク質の誘導体を固定化した細胞付着部材を見だし、該タンパク質の誘導体を遺伝子工学で生産して、本発明を完成するにいたった。

【0006】つまり、本発明は前記の背景のもとになされたものであり、本発明の細胞付着タンパク質の誘導体を担体に固定化した新規な細胞付着部材は、前記の課題を解決する方法を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、D2領域およびTM領域をもたず細胞質内領域を部分的にもつカルボキシル末端に唯一のシステイン残基を有するLFA-3誘導体タンパク質を担体に固定化した細胞付

着部材ならびにD2領域およびTM領域をもたず細胞質内領域を部分的にもつカルボキシル末端に唯一のシステイン残基を有するLFA-3誘導体タンパク質のチオール基を介して該タンパク質を担体に固定化した細胞付着部材に関する。

【0008】前記細胞付着部材において好ましくは、前記LFA-3誘導体タンパク質がヒツジまたはヒトに由来し、さらに好ましくは、前記LFA-3誘導体タンパク質が、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるヒツジ由来のタンパク質または配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるヒト由来のタンパク質である。また、前記細胞付着部材は、好ましくは白血球を除去しうる、T細胞を分離回収しうる、白血球からのDNAあるいはRNAの分離を可能とする細胞付着部材である。

【0009】さらに本発明は、前記細胞付着部材を用いて、CD2陽性細胞または白血球を付着分離する方法に関する。好ましくは、前記方法は前記細胞付着部材と、CD2陽性細胞または白血球を含みうる体液を接触させることにより付着分離する方法である。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明にしたがい担体への固定化に用いるタンパク質について説明する。

【0011】本発明に用いるタンパク質である、D2領域およびTM領域をもたず細胞質内領域を部分的にもつLFA-3誘導体タンパク質は、特開平5-271292号公報に示している通り、一本鎖のポリペプチドで、タンパク質部分の分子量約13,000のタンパク質であり、LFA-3タンパク質(T細胞に存在するCD2に対する受容体)からD2領域およびTM領域が除かれ、かつ細胞質内領域が部分的に除かれたものでカルボキシル末端に唯一のシステイン残基が存在する構成を有している。ここでD2領域とは、LFA-3タンパク質の2つの免疫グロブリン様領域のうち、アミノ末端から2番目の免疫グロブリン様領域であって、ゲノム性DNA上でイントロンによって他の領域と分断されてコードされている領域をいい、ヒトおよびヒツジでは6つのシステイン残基を有する。LFA-3に比べ、カルボキシル末端に唯一のシステイン残基を有するD2領域をもたない本発明に用いられるLFA-3誘導体タンパク質は低分子量であり、LFA-3では分子内に複数のジスルフィド結合があるのに対して、本発明に用いられるLFA-3誘導体タンパク質では2つ以上ない。したがって、本発明に用いるタンパク質は抗原性が低く、遺伝子組み換え技術によって生産する上で、誤ったジスルフィド結合を形成する心配のないことから、大変有利である。このようにして唯一のシステイン残基が導入された誘導体からは、そのシステイン残基のチオール基を介して種々の担体に固定化することができる。疎水結合により担体に固定化する方法に関しては、すでに、特開平5-271292号公報に示している通りである。

【0012】本発明に用いるLFA-3誘導体タンパク質を担体に固定化する方法を説明する。前記担体の材料としては、ポリスチレン、ガラス、セルロース、ポリビニルアルコール、ポリサルフォン、シリカゲルなどがあげられる。固定化に用いる担体の形状としては、タンパク質を固定化しうるものであれば何でも用いられうる。たとえば、ポリスチレンを用いるときにはリガンドであるタンパク質を固定化する面積が広がるので、好ましくはプレート、シャーレおよびビーズ、より好ましくはビーズである。本発明に用いるタンパク質は共有結合などの結合によって担体に固定化することができる。

【0013】より効果的に本発明に用いるタンパク質を固定化するには、カルボキシル末端に存在するシステイン残基のチオール基を介して担体に固定化する。このことによりタンパク質分子の方向性を揃えることが可能になる(図1参照)。さらに加えてタンパク質分子をより高密度に固定化するには、チオール基を活性ハロゲン法、活性エステル法、ビビリジンジスルフィドの交換反応法、マレイミド法やチオフタルイミド法などを用いて共有結合的に担体に固定化する。

【0014】ここで「CD2陽性細胞」とはCD2分子を細胞表面に発現している細胞を意味する。

【0015】本発明に用いるタンパク質を担体に固定化した細胞付着部材を用いて、CD2陽性細胞の付着分離を行うには、担体がプレートのばあいには、CD2陽性細胞とCD2陰性細胞の混合細胞を前記タンパク質固定化プレートの上にまき、ついでリン酸緩衝液などでプレートを洗浄したのちにプレート上の細胞が、CD2陽性か陰性かを細胞を回収してフローサイトメトリーを用いた方法によって調べればよい。担体がビーズのばあいには、ビーズをカラムに充填したものに、CD2陽性細胞とCD2陰性細胞の混合細胞をアプライし、ついでリン酸緩衝液などでカラムを洗浄したのちにカラム内の細胞がCD2陽性か陰性かを前記と同様に調べればよい。

【0016】本発明によるタンパク質を担体に固定化した細胞付着部材を用いて、白血球の付着分離を行うには、担体がビーズのばあいには、ビーズをカラムに充填したものに、末梢血を直接アプライし、ついでリン酸緩衝液などでカラムを洗浄したのちにカラム内の細胞を同定するか、もしくはカラムを通過してきた細胞を同定し、カラム内の細胞を推定することにより前記カラムに白血球細胞、中でも主にT細胞、単球、そして好中球が付着することを示すことができる。

【0017】ここで「体液」とは血液、血漿、血清、腹水、リンパ液、関節内液およびこれらからえられた画成分、ならびにその他の生体由来の液性成分を意味する。

【0018】本発明の細胞付着部材が、T細胞の表面抗原であるCD3、CD4あるいはCD8に対する抗体を担体に固定化したビーズを充填したカラムやプレートに

比べて、CD2陽性細胞の回収率が高いことを示すには、たとえばCD3に対する抗体との比較であれば、CD3に対する抗体と本発明に用いる誘導体タンパク質の等量を担体の1例としてポリスチレンビーズに固定化してカラムを作製し、このカラムに細胞、たとえばT細胞の株化細胞であるジャーカット細胞(CD2陽性細胞)やヒト末梢血をアプライし、溶出された細胞数を数えることで示すことができる。

【0019】慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の主たる病因物質は自己抗体および自己抗体と抗原の複合体であるとされているので、自己抗体の産生に関係する白血球を除去することにより、自己免疫疾患の根本的な治療となる。本細胞付着部材は白血球を付着除去できるので、自己免疫疾患患者の末梢血を本細胞付着部材に接触させ自己抗体を産生する白血球を除去することができる。

【0020】輸血後の副作用として知られている移植片対宿主反応や非溶血性発熱反応、サイトメガロウイルス、HTLV-1などのウイルスの伝播は輸血中に含まれる白血球が原因で起こることが知られているので、白血球を除去することにより、これらの副作用を防止することができる。本発明の細胞付着部材は白血球を付着除去できるので、輸血する血液を本細胞付着部材で処理することによりこれらの副作用を防止することができる。

【0021】また本細胞付着部材は、コーエンら(Ben-Nun, A., Wekerle, H. & Cohen, I. R.): ワクシネーション・アゲインスト・オートイムン・エンセファロマイリチス・ウィズ・ティー・リンホサイト・ライン・セルズ・リアクティブ・アゲインスト・ミエリン・ベーシック・プロテイン(Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein)、ネイチャー(Nature)、292巻:60頁、1981年参照)が提唱したT細胞ワクチンの考え方を治療に応用するばあいの、T細胞を大量に回収する際に利用することができる。多発性硬化症などの自己免疫疾患患者の末梢血から、本細胞付着部材を用いて白血球、中でも主としてT細胞を撹拌、もしくはトリプシンなどのタンパク質分解酵素処理により回収してから、抗原もしくはコンカナバリンAのようなマイトジェンで活性化し、X線照射やマイトマイシン処理して不活化したのち、患者に免疫することにより、抗原特異的な免疫寛容が誘導されて、自己免疫疾患が治療できる。

【0022】さらに本細胞付着部材を使って非常に簡単に、白血球からDNAあるいはRNAを分離することもできる。本発明に用いるタンパク質をビーズに固定化し

てカラムを作製し、そのカラムに末梢血をアプライすると、カラムには白血球、主としてT細胞が付着しているので、動物細胞からのDNAの調製方法にしたがい、まずドデシル硫酸ナトリウム(以下、SDSともいう)およびプロテインキナーゼKを含むリシス緩衝液をカラム内にアプライし、50℃で3時間加温する。つぎに細胞中の高分子DNAをカラムから溶出し、フェノール抽出によりDNAを精製することによりDNAがえられる。RNAのばあいはグアニジン・イソチオシアネイト液をカラム内にアプライし細胞を溶解してトータルRNAを抽出する。あるいはより簡便に行うには、加温したフェノールをアプライし、ホットフェノール法によりトータルRNAを調製することもできる。これに対しRT-PCRを行い相補的DNAを調製することもできる。

【0023】このようにして調製したDNAを鋳型にして、PCR法により、遺伝子診断を行うこともできる。

【0024】

【実施例】つぎに本発明を実施例にもとづいて説明するが、本発明はもとよりかかる実施例のみに限定されるものではない。

【0025】実施例1

a. ポリスチレンと反応する活性化ハロゲンの作製

2-ブromoアセトアミド(アルドリッチ社製)37gを蒸留水75mlに懸濁し、そこに37%ホルムアルデヒド20mlと炭酸カリウム2.5gを加え、スターラーで10分間、室温で撹拌して沈殿を完全に溶解した。この溶液をナス型フラスコに入れて、4℃で一晩静置したのち、上清をデカンテーションにより捨て、蒸留水を50ml加えたのち42℃で沈殿を溶解し、4℃で一晩再び静置した。この操作を4回繰り返してから、生じた沈殿をG-3のガラスフィルター(フィルター径30mm:日本理化学器械(株)社製)を通過させることにより回収し、1時間アスピレーターにて吸引乾燥してから、24時間凍結乾燥し、ポリスチレンと反応する活性化ハロゲンであるN-ヒドロキシルメチル-2-ブromoアセトアミドを調製した。

【0026】b. 活性化ハロゲンポリスチレンプレートの作製

ポリスチレンプレート(高さ20mm×直径90mm:西部(株)社製)はガンマー線滅菌処理していないものを用い、1M塩酸で室温、1時間処理後、蒸留水で洗浄し、つぎに1M水酸化ナトリウムで室温、1時間処理し、蒸留水で洗浄した。つぎに前記aで調製したN-ヒドロキシルメチル-2-ブromoアセトアミド335mgをテトラメチレンスルホン10mlに溶解し、一方、トリフルオロメチルスルホン酸3mlをテトラメチレンスルホン7mlに混合したものと前記溶液を合体し、それを速やかに前記の洗浄後のポリスチレンプレート上にアプライした。外気を遮断し密封した状態で室温で5時間振とうした。さらに反応液を捨てたのち、蒸留水で1回

プレート洗浄して乾燥し、活性化ハロゲンポリスチレンプレートを作製した。

【0027】c. LFA-3誘導体タンパク質のポリスチレンプレートへの固定化

以下の参考例に記載されたように大腸菌を宿主にして作製したLFA-3誘導体タンパク質(1mg/ml)

2. 5mlにジチオスレイトールを最終濃度50mMになるように加え、室温で1時間反応させたのち、速やかにゲル透過カラムPD10(9.1ml、口径15mm×高さ50mm:ファルマシア社製)にアプライし、ホウ酸0.62g、塩化カリウム0.75g、1M水酸化ナトリウム2mlおよび蒸留水148mlを混合して作製した50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)3.0mlで溶出し、タンパク質画分のみを回収した。この回収画分(100μg/ml)300μlを前記bでえた活性化ハロゲンポリスチレンプレートに加え、室温で2時間静置したのち、前記の50mMホウ酸緩衝液に2-メルカプトエタノールを最終濃度50mMになるように加えた溶液300μlに置換し、室温で1時間静置した。前記プレート上の溶液を捨ててから、プレート表面を等張リン酸緩衝液300μlで2回洗浄した。

【0028】d. LFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンプレートへのCD2陽性細胞の付着

LFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンプレート上に、等張リン酸緩衝液に懸濁したヒト株化細胞であるCD2陽性のジャーカット細胞とCD2陰性のジャーカット細胞(2×10⁶個/ml)300μlをそれぞれ4℃で1時間静置し、一方、対照として、2-メルカプトエタノールをLFA-3誘導体タンパク質と同様に固定化したポリスチレンプレートにも同様の細胞を静置した。1時間後、細胞懸濁液を捨て、等張リン酸緩衝液1mlでプレートを洗浄した。前記プレートを倒立顕微鏡(倍率×100)で見て付着している細胞の有無を確認すると、LFA-3誘導体タンパク質を固定化したプレートにCD2陽性の細胞はほとんど付着していたが、CD2陰性の細胞はほとんど付着していなかった(図2参照)。一方、タンパク質を用いなかった以外は前記cと同様にして作製した、対照の2-メルカプトエタノールを固定化したプレートには、CD2陽性、陰性いずれの細胞もほとんど付着しなかった。

【0029】実施例2

e. 活性化ハロゲンポリスチレンビーズの作製

ポリスチレンビーズ(直径450μm:鐘淵化学工業株式会社製)はガンマー線滅菌処理していないものを用い、1.5gをメタノール5mlに懸濁し、ガラスカラム(口径1.0cm×高さ2.0cm:バイオラッド社製)に充填した。つぎにメタノール15mlでポリスチレンビーズを洗浄後、さらにテトラメチレンスルホン15mlで洗浄、ついで蒸留水15mlで洗浄した。引き続き1M塩酸15mlで1時間処理後、蒸留水で洗浄

し、つぎに1M水酸化ナトリウム15mlで1時間処理し、蒸留水で洗浄した。つぎに再びポリスチレンビーズをテトラメチレンスルホン15mlで洗浄後、前記aで調製したN-ヒドロキシメチル-2-ブロモアセトアミド335mgをテトラメチレンスルホン10mlに溶解し、一方、トリフルオロメチルスルホン酸3mlをテトラメチレンスルホン7mlに混合したものと前記溶液を合体し、そのうち7.5mlを前記のポリスチレンビーズカラムにアプライした。外気を遮断し密封した状態で室温で2.5時間振とうした。さらに反応液を捨てたのち、再び7.5mlの合体溶液をカラムにアプライし、密封状態で室温にて2.5時間振とうしたのち、蒸留水で1回カラムを洗浄してから、デシケーター内で乾燥し、活性化ハロゲンポリスチレンビーズを作製した。

【0030】f. LFA-3誘導体タンパク質のポリスチレンビーズへの固定化

前記cと同様に大腸菌を宿主にして作製したLFA-3誘導体タンパク質(1mg/ml)2.5mlにジチオスレイトールを最終濃度50mMになるように加え、室温で1時間反応させたのち、速やかにゲル透過カラムPD10(9.1ml、口径15mm×高さ50mm:ファルマシア社製)にアプライし、ホウ酸0.62g、塩化カリウム0.75g、1M水酸化ナトリウム2mlおよび蒸留水148mlを混合して作製した50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)3.0mlで溶出し、タンパク質画分のみを回収した。活性化ハロゲンポリスチレンビーズ0.5gを充填したカラム(直径1.0cm、孔径100μm、高さ7mm:バイオラッド社製)に対し、この回収画分(100μg/ml)0.5mlをアプライし、タンパク質溶液を0.1ml/分の流速で通過させ、通過液を再びカラムに通し、この操作を5回繰り返した。つぎに前記cで調製した50mMホウ酸緩衝液に1%ウシ血清アルブミンを加えた溶液5mlを、同様の流速でカラムを通過させ、さらに等張リン酸緩衝液5mlを通過させた。

【0031】g. LFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラムでの末梢血からの白血球の付着除去

ヒト末梢血0.5mlを10%クエン酸ナトリウム採血し、前記fでえられたLFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラムに0.02ml/分の流速でアプライし、さらに等張リン酸緩衝液1.0mlにて0.06~0.18ml/分の流速で3回カラムを洗浄した(えられたカラムを以下、「LFA-3カラム」という)。対照としてLFA-3誘導体タンパク質のかわりにウシ血清アルブミン(BSA)を固定化したポリスチレンビーズカラムでも全く同様の操作を行った(えられたカラムを以下、「BSAカラム」という)。10%クエン酸ナトリウム採血したヒト末梢血0.5mlに等張リン酸緩衝液3mlを加えたものと、カラムを通過し

た回収血液からそれぞれ2mlを血液成分検査に供し、残りは標識抗体を用いたフローサイトメトリー実験（コールター社製フローサイトメーター使用）に用いた。

【0032】以下にフローサイトメトリー実験の条件について述べる。

【0033】ポリスチレンチューブ（直径12mm×高さ75mm、ベクトンディッキンソン社製）に、抗CD3抗体（PE標識、コールター社製）10 μ lを分注した。

【0034】つぎにカラムを通過した回収血液1.5mlおよび10%クエン酸ナトリウム採血したヒト末梢血0.5mlに等張リン酸緩衝液3mlを加えたものから1.5mlをそれぞれ前記の抗体を入れたチューブに加え、ボルテックスミキサー（井内盛栄堂社製）で5秒間よく混和した。前記チューブを碎氷を入れた保冷箱に入れ、アルミホイルで遮光し、30分間放置した。塩化ナトリウム8.26gに、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム45mgおよび重炭酸カリウム1.0gを加え、蒸留水に溶解し1lにした溶血試薬の1.5mlを前記チューブに加え、ボルテックスミキサーで10秒間よく混和し、再度、前記溶血試薬1.5mlをチューブに加え、ボルテックスミキサーで10秒間よく混和した。つぎに37℃で15分間遮光放置し、赤血球を溶血させ、1,400rpm（410 \times g）、4℃で3分間遠心し、上清をアスピレーターで吸引除去した。細胞を洗浄するために、ボルテックスミキサーで3秒間細胞ペレットをほぐし、0.1%アジ化ナトリウムを含む等張リン酸緩衝液3mlを前記チューブに加え、ボルテックスミキサーで5秒間よく混和し、1,400rpm（410 \times g）、4℃で3分間遠心し、上清をアスピレーターで吸引除去した。これに0.1%アジ化ナトリウムを含む等張リン酸緩衝液1mlを加え、ボルテックスミキサーで軽く混和し、フローサイトメーターの測定サンプルとした。

【0035】フローサイトメーターでの測定にあたっては、リンパ球領域にゲーティングし、PE（抗体CD3抗体）の陽性比率を分析した。

【0036】血液成分検査では白血球数、赤血球数、血小板数は多項目自動血球分析装置（東亜医用電子社製）

を用いて測定算出した。白血球像はメイギムザ染色により観察した。このようにして実施したカラム通過前後の細胞分析では、赤血球数（アプライ時77 \times 10⁴/mm³、LFA-3カラム通過80 \times 10⁴/mm³、BSAカラム通過77 \times 10⁴/mm³）、血小板数（アプライ時3.20 \times 10⁴/mm³、LFA-3カラム通過2.75 \times 10⁴/mm³、BSAカラム通過3.10 \times 10⁴/mm³）にはほとんど変化は認められなかったが、白血球数は減少（アプライ時700/mm³、LFA-3カラム通過467/mm³、BSAカラム通過667/mm³）しており、LFA-3カラムには白血球が付着していることが示された。その白血球の中でも、白血球像解析の結果から、顆粒球（アプライ時46.8%（好塩基球：1.35%+好酸球：4.05%+好中球：41.35%）、LFA-3カラム通過56.6%（好塩基球：1.85%+好酸球：5.60%+好中球：49.10%）、BSAカラム通過48.3%（好塩基球：2.05%+好酸球：5.45%+好中球：40.80%））、単球（アプライ時8.2%、LFA-3カラム通過8.1%、BSAカラム通過8.7%）の比率よりもリンパ球（アプライ時44.8%（リンパ球中のT細胞（CD2⁺およびCD3⁺）の比率：53.7%）、LFA-3カラム通過35.1%（リンパ球中のT細胞（CD2⁺およびCD3⁺）の比率：42.0%）、BSAカラム通過42.9%（リンパ球中のT細胞（CD2⁺およびCD3⁺）の比率：55.0%）の比率の減少が認められた。そのリンパ球の解析には、T細胞はCD3抗体（PE標識）を用いたフローサイトメトリー実験により行った。その結果、カラムアプライ時のCD3⁺率（標識CD3抗体と結合したCD3陽性細胞の%）が53.7%に対して、LFA-3カラム通過後では42.0%と減少していた。以上のデータを総合して考えると、カラムアプライ時のT細胞を100%とすると、本LFA-3カラムによりT細胞の59.1%が除去できたことになる。同様に算出したLFA-3固定化カラムおよびBSAカラムのヒト末梢血細胞の除去率を表1に示す。

【0037】

【表1】

表 1

ヒト末梢血細胞	細胞除去率(%)	
	LFA-3カラム	BSAカラム
白血球・リンパ球		
T細胞(CD2 ⁺ およびCD3 ⁺)	59.1	6.5
・単球	34.1	0
・好塩基球	8.6	0
・好酸球	7.7	0
・好中球	20.8	6.0
赤血球	0	0
血小板	14.1	3.1

実施例3

h. LFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラムとCD3抗体固定化ポリスチレンビーズカラムへのジャーカット細胞の付着率の比較

CD3抗体固定化ポリスチレンビーズカラムおよびウシ血清アルブミン(BSA)固定化ポリスチレンビーズカラムの作製は以下のように実施した。等張リン酸緩衝液を用いて調製した、ジチオスレイトールによる還元処理を行っていない800 μ g/mlのタンパク質濃度のCD3抗体溶液およびウシ血清アルブミン溶液をそれぞれ、実施例2のeと同様にしてえた0.5gの活性化ハロゲンポリスチレンビーズを充填したカラム(口径1.0cm×高さ7mm:バイオラッド社製)(以下、前者を「CD3抗体カラム」、後者を「BSAカラム」という)にアプライし、タンパク質溶液を0.1ml/分の流速で通過させ、通過液を再びカラムに通し、この操作を5回繰り返した。つぎに、前記cで調製した50mMホウ酸緩衝液に1%BSAを加えた溶液5mlを、同様の流速でカラムを通過させ、さらに等張リン酸緩衝液5mlを通過させた。LFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラム(以下、「LFA-3カラム」という)は活性化ハロゲンポリスチレンビーズ0.5gを用い前記fの方法で作製した(0.5gのビーズ中LFA-3誘導体タンパク質の固定化量は300 μ gであった)。これら3つのカラムに、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地5mlを通したのち、CD2陽性かつCD3陽性のジャーカット細胞 2×10^6 を10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地1mlに懸濁して、カラムに0.2ml/分の流速でアプライし、通過してきた細胞を回収した。つぎに、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地1mlでカラムを4回洗浄した。このときに通過してきた細胞も回収した。カラムを通過してきた細胞数を血球計算盤で数えると、各カラムの全溶出細胞数は、LFA-3カラムで8.5%、CD3抗体カラムで46.0%、そしてBSAカラムで81.8%であった。逆にいうと、LFA-

3カラムは91.5%の細胞を付着し、CD3抗体カラムは54.0%、BSAカラムは18.2%の細胞しか付着できなかったことを示している。

【0038】i. LFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラムとCD3抗体固定化ポリスチレンビーズカラムへのヒト末梢血からのリンパ球の付着率の比較

LFA-3カラム、CD3抗体カラムおよびBSAカラムの作製方法は前記hと同様にして行った。これら3つのカラムに、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地5mlを通したのち、10%クエン酸ナトリウム採血したヒト末梢血1.2mlを前記カラムにアプライした。1.2mlの等張リン酸緩衝液で前記カラムを洗浄し、さらに、1.6mlの等張リン酸緩衝液で再度洗浄した。ここで各カラム通過画分からフィコールバック(ファルマシア社製)でリンパ球画分を調製し、リンパ球数を血球計算盤で数えた。各カラムの溶出リンパ球数は、LFA-3カラムで57.3%、CD3抗体カラムで88.4%、そしてBSAカラムで87.4%であった。逆にいうと、LFA-3カラムは42.7%のリンパ球を付着し、CD3抗体カラムは11.6%、BSAカラムは12.6%のリンパ球しか付着できなかったことを示している。

【0039】実施例4

j. LFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラムでの、簡便な白血球からのDNAの分離
前記fで作製したLFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラムに、10%クエン酸ナトリウム採血したヒト末梢血0.5mlをアプライし、さらに等張リン酸緩衝液1.0mlにて、0.06~0.18ml/分の流速で3回カラムを洗浄すると、カラムには白血球、主としてT細胞が付着しているので、動物細胞からのDNA調製方法にしたがい、150mM塩化ナトリウム、15mM酢酸ナトリウム、100mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(pH8.0)、100 μ g/mlプロテイナーゼKおよび1%SDSからなるリン

ス緩衝液を5mlカラムにアプライし、リシス緩衝液がカラムから流出しないようにして、50℃で3時間加温した。この操作によりDNAは細胞外に出てくるので、こののち、リシス緩衝液をカラム内から流出させてDNAを回収した。さらにDNAの精製を行なうために、えられたDNA5ml(100μg含有)に10mMトリスおよび1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムからなる溶液(pH8.0)で飽和したフェノールを等量加えて、混和したのち、3,000回転で室温で10分間遠心分離し、フェノール層を除去し、水層を回収した。再度このフェノール抽出を繰り返した。さらに、この水層を透析チューブ(和光純薬工業社製)に移し、10mMトリスおよび1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムからなる溶液(pH8.0)1000mlに対し1回目は室温で12時間透析し、2回目、3回目の透析は4℃で12時間ずつ実施した。透析チューブからポリアロマーチューブにDNAを移し、100分の1量のアルエヌエースA液(10mg/ml)を加え、37℃で3時間インキュベートした。等量のフェノール/クロロホルムを加え、混和し、3,000回転、5分間遠心分離し、フェノール/クロロホルム層を捨て、さらにもう1回この操作を繰り返した。最後に、10mMトリスおよび1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムからなる溶液(pH8.0)1000mlに対し1回目は室温で12時間透析し、2回目、3回目の透析は4℃で12時間ずつ実施した。

【0040】k. LFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラムでの、簡便な白血球からのRNAの分離

前記fで作製したLFA-3誘導体タンパク質固定化ポリスチレンビーズカラムに、10%クエン酸ナトリウム採血したヒト末梢血0.5mlをアプライし、さらに等張リン酸緩衝液1.0mlにて0.06~0.18ml/分の流速で3回カラムを洗浄すると、カラムには白血球、主としてT細胞が付着しているので、10mMトリス塩酸、100mM塩化ナトリウムおよび1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムからなる溶液(pH7.5)5mlをカラムに通したのち、氷冷した10mMトリス塩酸、100mM塩化ナトリウムおよび1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムからなる溶液(pH7.5)5mlをカラムにアプライし、カラムから流出させないようにして、ビーズごと細胞を懸濁した。これに0.25mlの10%SDSを加え、直ちにあらかじめ65℃に加温したフェノールを加えた。攪拌しながら、65℃に15分間放置したのち、さらに室温で10分間振とうした。ここでカラム中の溶液を通過させ、通過してきた溶液を3,000回転、10分間遠心し、水層を回収した。さらにフェノール抽出を2回、クロロホルム抽出を1回行い、エタノール沈殿した。この沈殿を

10mMトリス塩酸および10mM塩化マグネシウムからなる溶液(pH7.5)300μlに溶解し、140単位のディーエヌエースIを加え、4℃、3時間反応させた。このものからRNAをフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿し、精製したRNAをえた。

【0041】実施例5

1. 固定化方法のちがいによるLFA-3誘導体タンパク質へのCD2陽性細胞の付着の比較

実施例1のbで作製した活性化ハロゲンポリスチレンプレートでは、チオール基を介した結合のほうがアミノ基を介した結合よりも優先的に反応するので、LFA-3誘導体タンパク質を実施例1のcに記載の方法で固定化ポリスチレンプレート上に固定化した付着部材と、以下の参考例に記載されたように作製したLFA-3誘導体タンパク質を200μg/mlとなるように等張リン酸緩衝液400mlに溶解し、その溶液を活性化ポリスチレンプレート(実施例1のbで作製したもの)上で室温、1時間静置することによりアミノ基を介して固定した付着部材とを作製した。等張リン酸緩衝液に懸濁したヒトT細胞株化細胞であるCD2陽性のジャークット細胞とCD2陰性のジャークット細胞(2×10⁶個/ml)300μlをそれぞれ4℃で1時間静置した。一方、対照として、フリーのシステイン残基を1つもつカルボニックアンヒドラーゼ200μg/mlおよび2-メルカプトエタノール50mMを前記と同様にして固定化ポリスチレンプレートおよび活性化されたポリスチレンプレートに前記と同様にして細胞を静置した。1時間後、細胞懸濁液を捨ててから、等張リン酸緩衝液で各プレートを洗浄した。各プレートを倒立顕微鏡(倍率×100)で観察し、付着している細胞の有無を確認した。写真を撮り、一定面積下の付着している細胞数をカウントした。その結果、チオール基を介して固定化したLFA-3誘導体タンパク質を固定化したプレートには、CD2陽性の細胞がほとんど付着していたが、CD2陰性の細胞はほとんど付着していなかった。一方、対照のカルボニックアンヒドラーゼおよび2-メルカプトエタノールを固定化したプレートには、CD2陽性、陰性いずれの細胞もほとんど付着しなかった。またアミノ基を介して固定化したプレートにはいずれの細胞もほとんど付着しなかった。なお、LFA-3誘導体タンパク質(MW:約13,000)およびカルボニックアンヒドラーゼ(MW:約30000)のプレートへの固定化されたタンパク質量はそれぞれ4.5μg/cm²および3.6μg/cm²であった。

【0042】表2に、0.05%クリスタルバイオレットにより染色した各プレートを写真に撮り、写真(3cm×3cm)の細胞数をカウントした結果を示す。

【0043】

【表2】

表 2

プレート	付着したCD2陽性のジャーカット細胞数(個)	
	SH-	NH ₂ -
LFA-3誘導体タンパク質 固定化プレート	247	30
カルボニックアンヒドラーゼ 固定化プレート	11	14
2-メルカプトエタノール 固定化プレート	14	8

実施例6

m. LFA-3誘導体タンパク質とCD3抗体を固定化したプレートのCD2陽性およびCD3陽性細胞の付着の比較

実施例5の1と同様にして、LFA-3誘導体タンパク質をチオール基を介してプレートに固定化した(以下、LFA-3固定化プレートともいう)。固定化したタンパク質量は $4.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。一方、等張リン酸緩衝液を用いて調製した、CD3抗体 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($3.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)およびウシ血清アルブミン(BSA) $300 \mu\text{l}$ ($3.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)を室温で1時間静置することによりアミノ基を介してプレートに固定化した(以下、「CD3抗体固定化プレート」および「BSA固定化プレート」ともいう)。フローサイトメーター(コールター社製)により等張リン酸緩衝液に懸濁したCD2、CD3共に同程度ジャーカット細胞の表面に発現していることを確認している細胞(CD2⁺およびCD3⁺のジャーカット細胞)および両者共に発現していないジャーカット細胞(CD2⁻およびCD3⁻のジャーカット細胞)をプレートに(2×10^6 個/ ml) $300 \mu\text{l}$ アプライし、4℃で1時間静置し、そののち細胞懸濁液を捨て、等張リン酸緩衝液で洗浄した。その結果、LFA-3誘導体タンパク質をチオール基を介して固定化したプレートにのみCD2⁺およびCD3⁺のジャーカット細胞が付着した。その他のプレートには付着しなかった。またCD2⁻およびCD3⁻のジャーカット細胞はいずれのプレートにもほとんど付着しなかった。付着の程度はプレートに付着しているジャーカット細胞を0.05%クリスタルバイオレットで染色することにより観察した。

【0044】図3にその結果を示す。

【0045】参考例

大腸菌を宿主としたLFA-3誘導体タンパク質の作製
a. ヒツジD2領域欠失型LFA-3様タンパク質(以下、ヒツジΔD2タンパク質と呼ぶ)cDNAのPCR用プライマーの合成

ヒツジCD2抗原受容体については配列番号3に示したように29アミノ酸残基からなるN末端アミノ酸配列が開示されている(特開昭63-150228号公報参

照)。ヒツジΔD2タンパク質cDNAのPCR用プライマーとして、制限酵素BamHIの認識配列を含む配列と引き続く配列番号3の1番から7番のアミノ酸配列から予想されるDNA配列とを有する配列番号4で示される混合プライマー、および制限酵素PstIの認識配列を含む配列と引き続く配列番号3の27番から22番のアミノ酸配列から予想されるDNA配列とを有する配列番号5で示される混合プライマーをDNA合成機(アプライドバイオシステムズ社、モデル381A)を使用し合成した。

【0046】b. ヒツジ細胞由来二重鎖cDNAの調製
ヒツジから血液100mlをヘパリン採血し、350G、10分の遠心によりパフィーコート画分をえた。赤血球溶解液で赤血球を溶解後、等張リン酸緩衝液で2回洗浄しヒツジ白血球細胞をえた。つぎにヒツジ白血球細胞からチオシアン酸グアニジン法によりRNAを抽出し、さらにオリゴ(dT)セルロースカラムによりポリ(A)⁺RNAを精製した(ラボマニユアル遺伝子工学、村松正実編、丸善 1988年)。ポリ(A)⁺RNAからの二重鎖cDNAの合成は市販のキット(Yo-u-Prime cDNA合成キット ファルマシア社製)を用いて合成した。

【0047】c. ヒツジΔD2タンパク質のDNA配列のPCR法による増幅とクローニング

ヒツジΔD2タンパク質のcDNAをPCR法によって試験管内で増幅した。すなわち10mMトリス塩酸(pH8.3)、100mM塩化カリウム、1.5mM塩化マグネシウム、0.01%ゼラチン、前記aで合成した2種類の混合プライマー各々10μM、前記bで調製したヒツジ白血球cDNA 10ng、0.2mM 4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、Taq DNAポリメラーゼ2.5単位を含む反応混合物100μlを94℃1分、37℃2分、72℃2分の反応条件で35サイクルのPCRを行なった。反応後、PCR生成物の大きさをポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定した結果、約100塩基対のDNAが増幅されていることを認めた。この約100塩基対のDNAをゲルから抽出し、制限酵素BamHI、PstI処理後、M13mp19ファージベクター(宝酒造製)のBamHI-PstI

部位に組み込み、大腸菌JM109を宿主として用いてクローニングした。

【0048】d. PCRによって増幅された遺伝子の配列決定

前記cでえられた陽性クローンから調製した約100塩基対のDNAの配列をダイデオキシヌクレオチド三リン酸を用いた常法により決定した。その結果、PCRに用いた2種のプライマー間の配列は、配列番号6で示されるDNAの配列の19番から65番までの塩基配列であると決定された。この配列はのちに決定されたヒツジ△D2タンパク質のアミノ酸配列である配列番号7の7番のGlyから22番のProに対応しており、ヒツジ△D2タンパク質のcDNAが前記の塩基配列を有することを示している。このDNA配列は配列番号7の7番から22番のアミノ酸をコードしている。

【0049】e. ヒツジ△D2タンパク質のcDNAの取得

ヒツジ△D2タンパク質の全長のcDNAをクローニングするために、前記dで決定したヒツジ△D2タンパク質のN末端のcDNA配列をプローブとしてヒツジcDNAライブラリーをスクリーニングした。すなわち、前記bで作ったヒツジ白血球由来の二重鎖cDNAをDNAポリメラーゼ処理で平滑末端にし、EcoRIリンカー（ファルマシア社製）を接続し、さらにEcoRIで切断し、アルカリフォスファターゼ処理したλgt11（ストラタジーン社製）の左右のアームを接続した。インビトロパッケージングを行ないcDNAライブラリーを作製した。ヒツジ△D2タンパク質のN末端近傍のcDNA配列を有するプローブ、配列番号8および配列番号9を合成した。約20万の組換えファージをこれらのプローブでスクリーニングした結果、1.0kb（キロベース）～1.2kbのインサートcDNAを含有する3株の陽性クローン（SL-6、SL-40、SL-43）をえた。これらの陽性クローンのうち、SL-40のcDNA配列をM13ファージを用いたダイデオキシ法により決定した結果、ヒツジ△D2タンパク質は配列番号6に示した塩基配列によりコードされ、また配列番号7に示したアミノ酸配列を有することがわかった。またメチオニンから始まる28アミノ酸残基のシグナルペプチドを有することもわかった。このえられたヒツジ△D2タンパク質のcDNA塩基配列の情報にもとづき天然型のヒツジ△D2タンパク質および誘導体を、遺伝子工学的に組換え体で生産できる。配列番号10は、ウォルナーら（ビーピーウォルナーら、(1987年)ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン166巻、923頁）によって報告されているヒトLFA-3のアミノ酸配列、配列番号11はそのDNA配列である。

【0050】f. 可溶性であるヒツジ△D2タンパク質誘導体（以下、ヒツジD1HCタンパク質と呼ぶ）の大

腸菌の発現ベクターの作製

ヒツジD1HCタンパク質を大腸菌で発現するための発現ベクターを構築した。

【0051】すなわち、前記eでえられたcDNAクローンSL-40に含まれるインサートDNAを制限酵素EcoRIで切り出し、プラスミドpUC18のEcoRI部位にサブクローニングした。つぎに、このプラスミドについてPCRを行なった。使用した5'側プライマーは配列番号12に示されている。このプライマーはBamHI認識配列、NcoI認識配列および配列番号6の1番から7番のアミノ酸配列から予想されるDNA配列とから構成されている。使用した3'側プライマーは配列番号13に示されている。このプライマーはPstI認識配列、終止コドンの配列、配列番号6の371番から358および301から277の塩基配列とから構成されている。配列番号12と13のプライマーを用いてPCRを行ない、増幅されたDNA断片を制限酵素BamHIとPstIで切断しM13mp19ファージベクターのBamHI-PstI部位に挿入し、ダイデオキシ法により導入されたDNAの塩基配列を確認した。つぎにM13ファージベクターからヒツジD1HCタンパク質の遺伝子を制限酵素NcoIおよびPstIで切りだし、発現用ベクターpKK233-2（ファルマシア社製）のNcoI-PstI部位に接続し、発現ベクターを作製した。この発現ベクターをpKSLD1HCと呼ぶ。pKSLD1HCに含まれるヒツジD1HCタンパク質誘導体をコードする開始コドンから終止コドンまでの塩基配列を配列番号14に示した。

【0052】g. システイン残基を含むヒツジD1HCタンパク質（以下、ヒツジD1HCcysタンパク質と呼ぶ）誘導体の大腸菌用発現ベクターの作製

システイン残基をカルボキシ末端に持つヒツジD1HCタンパク質を大腸菌で発現するための発現ベクターを構築した。前記fでえられたヒツジD1HCタンパク質のcDNAを持つプラスミドpKSLD1HCのDNAを鋳型にしてPCRを行なった。使用した5'側プライマーは前記fで使用したものであり、配列番号12に示されている。使用した3'側プライマーは配列番号15に示されている。このプライマーは、HindIII認識配列、PstI認識配列、終止コドン配列、システイン残基の配列、続いて配列番号14の318から295の塩基配列とから構成されている。配列番号12と15のプライマーを用いてPCRを行い、増幅されたDNA断片を制限酵素BamHIとPstIで切断しM13mp19ファージベクターのBamHI-PstI部位に挿入し、ダイデオキシ法により導入されたDNAの塩基配列を確認した。つぎにM13ファージベクターから、ヒツジD1HCcysタンパク質の遺伝子を制限酵素NcoIおよびPstIで切りだし、発現用ベクターpKK233-2（ファルマシア社製）のNcoI-PstI

部位に接続し、発現ベクターpKSLD1HCcysを作製した。pKSLD1HCcysに含まれるヒツジD1HCcysタンパク質（以下、「LFA-3誘導体タンパク質」という）をコードする開始コドンから終止コドンまでの塩基配列を配列番号1に示した。

【0053】h. 大腸菌を宿主としたLFA-3誘導体タンパク質の生産

LFA-3誘導体タンパク質の発現ベクターpKSLD1HCcysを持つ大腸菌JM109（宝酒造製）を前培養後、10mgのアンピシリンを含む100mlのLB培地に接種し、500mlの坂口フラスコでA500が0.3になるまで37℃で振とう培養した。つぎにIPTGを終濃度1mMで加え、さらに6時間培養した。培養した菌体を遠心により集め、50mMEDTA、5% TritonX-100、2mMジチオスレイトール、8%ショ糖を含有する50mMTris-HCl (pH 8.0) 10mlに懸濁し、リゾチームを終濃度0.1%加えた。この菌体懸濁液を超音波処理、遠心分離し不溶性の顆粒体をえた。この顆粒体をSDSで溶解させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動するとMrが約13,000のバンドが検出された。

【0054】i. LFA-3誘導体タンパク質の顆粒体の可溶化と再活性化

前記hでえられた顆粒体全量を6M塩酸グアニジン、2mMEDTA、5mM 2-メルカプトエタノールを

含有する50mMトリス塩酸 (PH7.4) 10mlで溶解し、遠心後上清をとった。上清を等張リン酸緩衝液に透析し、LFA-3誘導体タンパク質を含む溶液をえた。

【0055】

【発明の効果】本発明により、CD2陽性細胞、とくに白血球を付着分離することができ、自己免疫疾患を治療するための細胞付着部材、輸血後の副作用を防止するための輸血用血液から白血球を除去しうる細胞付着部材、T細胞を分離回収しうる細胞付着部材、T細胞の分離回収がT細胞ワクチン療法を単時間にかつ簡単に行なうことを実施するための細胞付着部材、および白血球からのDNAあるいはRNAの分離を短時間にかつ簡便に行なうことを可能とするための細胞付着部材が提供される。

【0056】本発明の細胞付着部材を用いることにより、自己免疫疾患の治療、輸血後の副作用防止、T細胞ワクチン療法および遺伝子診断が可能となる。

【0057】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：324

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

ハイボセティカル配列：No

配列

ATG GTA AGT CAA GAT ATT TAT GGA GCT ATG AAT GGG AAT GTA ACC TTT	48
Met Val Ser Gln Asp Ile Tyr Gly Ala Met Asn Gly Asn Val Thr Phe	
1 5 10 15	
TAC GTT TCA GAG TCT CAA CCG TTT ACA GAG ATT ATG TGG AAG AAG GGG	96
Tyr Val Ser Glu Ser Gln Pro Phe Thr Glu Ile Met Trp Lys Lys Gly	
20 25 30	
AAG GAT AAA GTT GTA GAA TGG GAT CAA ACA TCT GGA CTC GAA GCT TTT	144
Lys Asp Lys Val Val Glu Trp Asp Gln Thr Ser Gly Leu Glu Ala Phe	
35 40 45	
CAG TCT TTT AAA AAT AGA GTT CAT TTA GAC ATT GTG TCA GGT AAC CTC	192
Gln Ser Phe Lys Asn Arg Val His Leu Asp Ile Val Ser Gly Asn Leu	
50 55 60	
ACC ATC ACC GGG TTA ACA AAA TTA GAT GAA GAT GTG TAT GAA ATT GAA	240
Thr Ile Thr Gly Leu Thr Lys Leu Asp Glu Asp Val Tyr Glu Ile Glu	
65 70 75 80	
TCC CCA AGT GTT AAA AAG AGC TCC CAG TTC CAC CTC AGA GTG ATT GAT	288
Ser Pro Ser Val Lys Lys Ser Ser Gln Phe His Leu Arg Val Ile Asp	
85 90 95	
TAT GCA AGG CAT AGG TTT TCT GGG ACG TCG TGT TAG	324
Tyr Ala Arg His Arg Phe Ser Gly Thr Ser Cys	
100 105	

配列番号：2

配列の長さ：336

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

ハイボセティカル配列：No

配 列

ATG TTT TCC CAA CAA ATA TAT GGT GTT GTG TAT GGG AAT GTA ACT TTC	48
Met Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe	
1 5 10 15	
CAT GTA CCA AGC AAT GTG CCT TTA AAA GAG GTC CTA TGG AAA AAA CAA	96
His Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln	
20 25 30	
AAG GAT AAA GTT GCA GAA CTG GAA AAT TCT GAA TTC AGA GCT TTC TCA	144
Lys Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser	
35 40 45	
TCT TTT AAA AAT AGG GTT TAT TTA GAC ACT GTG TCA GGT AGC CTC ACT	192
Ser Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr	
50 55 60	
ATC TAC AAC TTA ACA TCA TCA GAT GAA GAT GAG TAT GAA ATG GAA TCG	240
Ile Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser	
65 70 75 80	
CCA AAT ATT ACT GAT ACC ATG AAG TTC TTT CTT TAT GTG CTT GGT CAT	288
Pro Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Gly His	
85 90 95	
TCA AGA CAC AGA GAC AGA AAA CCA GAC AGA ACC AAC TCC AAT TGT TGA	336
Ser Arg His Arg Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn Cys	

100

105

110

配列番号: 3

配列の長さ: 29

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 不明

配列の種類: ペプチド

ハイボセティカル配列: Yes

フラグメント型: N末端ペプチド

配列の特徴

配列中、12番目および28番目のXaa は天然に存在するアミノ酸を表わし、ここで12番目のXaa は好ましくはセリンである。

【0058】1番目のアミノ酸はバリンまたはフェニルアラニン、3番目のアミノ酸はグルタミンまたはセリンである。

配 列

Val/Phe Ser Gln/Ser Asp Ile Tyr Gly Ala Met Asn Gly Xaa Val Thr Phe Tyr	
1 5 10 15	
Val Ser Glu Ser Gln Pro Phe Thr Glu Ile Met Xaa Lys	
20 25	

配列番号: 4

配列の長さ: 29

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

配 列

GTTGGATCCT TYWSNCARGA YATHTAYGG	29
---------------------------------	----

配列番号: 5

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: Yes

配 列

ACACTGCAGC ATDATYTCNG TRAANGG	27
-------------------------------	----

配列番号: 6

配列の長さ: 393

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列: No

生物名: オーヴィス (Ovis)

起 源

細胞の種類: 白血球細胞

配 列

GTT TCC CAA GAT ATT TAT GGA GCT ATG AAT GGG AAT GTA ACC TTT TAC	48
Val Ser Gln Asp Ile Tyr Gly Ala Met Asn Gly Asn Val Thr Phe Tyr	
1 5 10 15	
GTT TCA GAG TCT CAA CCG TTT ACA GAG ATT ATG TGG AAG AAG GGG AAG	96
Val Ser Glu Ser Gln Pro Phe Thr Glu Ile Met Trp Lys Lys Gly Lys	
20 25 30	
GAT AAA GTT GTA GAA TGG GAT CAA ACA TCT GGA CTC GAA GCT TTT CAG	144
Asp Lys Val Val Glu Trp Asp Gln Thr Ser Gly Leu Glu Ala Phe Gln	
35 40 45	
TCT TTT AAA AAT AGA GTT CAT TTA GAC ATT GTG TCA GGT AAC CTC ACC	192
Ser Phe Lys Asn Arg Val His Leu Asp Ile Val Ser Gly Asn Leu Thr	
50 55 60	
ATC ACC GGG TTA ACA AAA TTA GAT GAA GAT GTG TAT GAA ATT GAA TCC	240
Ile Thr Gly Leu Thr Lys Leu Asp Glu Asp Val Tyr Glu Ile Glu Ser	
65 70 75 80	
CCA AGT GTT AAA AAG AGC TCC CAG TTC CAC CTC AGA GTG ATT GAT TAT	288
Pro Ser Val Lys Lys Ser Ser Gln Phe His Leu Arg Val Ile Asp Tyr	
85 90 95	
GCA AGG CAT AGG TAT GTG CTT TTT GCC ATA CTG CCA GCA GTA ATA TGT	336
Ala Arg His Arg Tyr Val Leu Phe Ala Ile Leu Pro Ala Val Ile Cys	
100 105 110	
GGC TTG CTG TTT TTA AAA TGT TTT CTG GGA CGT CGT AGC CAA CGA AAC	384
Gly Leu Leu Phe Leu Lys Cys Phe Leu Gly Arg Arg Ser Gln Arg Asn	
115 120 125	
TCA GGG CCC	393
Ser Gly Pro	
130	

配列番号: 7

配列の長さ: 131

配列の型: アミノ酸

起 源

生物名: オーヴィス (Ovis)

細胞の種類: 白血球細胞

配 列

Val Ser Gln Asp Ile Tyr Gly Ala Met Asn Gly Asn Val Thr Phe Tyr	
1 5 10 15	
Val Ser Glu Ser Gln Pro Phe Thr Glu Ile Met Trp Lys Lys Gly Lys	
20 25 30	
Asp Lys Val Val Glu Trp Asp Gln Thr Ser Gly Leu Glu Ala Phe Gln	
35 40 45	
Ser Phe Lys Asn Arg Val His Leu Asp Ile Val Ser Gly Asn Leu Thr	
50 55 60	
Ile Thr Gly Leu Thr Lys Leu Asp Glu Asp Val Tyr Glu Ile Glu Ser	
65 70 75 80	
Pro Ser Val Lys Lys Ser Ser Gln Phe His Leu Arg Val Ile Asp Tyr	
85 90 95	
Ala Arg His Arg Tyr Val Leu Phe Ala Ile Leu Pro Ala Val Ile Cys	
100 105 110	
Gly Leu Leu Phe Leu Lys Cys Phe Leu Gly Arg Arg Ser Gln Arg Asn	

115 120 125
Ser Gly Pro
130

配列番号: 8
配列の長さ: 24
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状
配列の種類: 他の核酸 合成DNA
ハイボセティカル配列: No

配 列
AGCTATGAAC GGGAATGTAA CCTT

24

配列番号: 9
配列の長さ: 24
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状
配列の種類: 他の核酸 合成DNA
ハイボセティカル配列: No

配 列
ACCTTTTACG TTTCAGAGTC TCAA

24

配列番号: 10
配列の長さ: 222
配列の型: アミノ酸
ハイボセティカル配列: No

起 源
生物名: ホモ サピエンス (Homo sapiens)
細胞の種類: PBL (末梢血リンパ球(Peripheral Blood Lymphocytes))

配 列
Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15
Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30
Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45
Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60
Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80
Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Pro Ser Pro Thr Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val
100 105 110
Gln Cys Met Ile Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met
115 120 125
Tyr Ser Trp Asp Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser
130 135 140
Ile Tyr Phe Lys Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr
145 150 155 160
Leu Ser Asn Pro Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr
165 170 175
Cys Ile Pro Ser Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro
180 185 190
Ile Pro Leu Ala Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly
195 200 205
Ile Leu Lys Cys Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn
210 215 220

配列番号: 11
配列の長さ: 753

配列の型: 核酸
鎖の数: 両形態

配列の種類: cDNA to mRNA

起 源

ハイボセティカル配列: No

生物名: ホモサピエンス (Homo sapiens)

配 列

ATG GTT GCT GGG AGC GAC GCG GGG CGG GCC CTG GGG GTC CTC AGC GTG	48
Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val	
-28 -25 -20 -15	
GTC TGC CTG CTG CAC TGC TTT GGT TTC ATC AGC TGT TTT TCC CAA CAA	96
Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln	
-10 -5 1	
ATA TAT GGT GTT GTG TAT GGG AAT GTA ACT TTC CAT GTA CCA AGC AAT	144
Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn	
5 10 15 20	
GTG CCT TTA AAA GAG GTC CTA TGG AAA AAA CAA AAG GAT AAA GTT GCA	192
Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala	
25 30 35	
GAA CTG GAA AAT TCT GAA TTC AGA GCT TTC TCA TCT TTT AAA AAT AGG	240
Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg	
40 45 50	
GTT TAT TTA GAC ACT GTG TCA GGT AGC CTC ACT ATC TAC AAC TTA ACA	288
Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr	
55 60 65	
TCA TCA GAT GAA GAT GAG TAT GAA ATG GAA TCG CCA AAT ATT ACT GAT	336
Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp	
70 75 80	
ACC ATG AAG TTC TTT CTT TAT GTG CTT GAG TCT CTT CCA TCT CCC ACA	384
Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr	
85 90 95 100	
CTA ACT TGT GCA TTG ACT AAT GGA AGC ATT GAA GTC CAA TGC ATG ATA	432
Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val Gln Cys Met Ile	
105 110 115	
CCA GAG CAT TAC AAC AGC CAT CGA GGA CTT ATA ATG TAC TCA TGG GAT	480
Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser Trp Asp	
120 125 130	
TGT CCT ATG GAG CAA TGT AAA CGT AAC TCA ACC AGT ATA TAT TTT AAG	528
Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser Ile Tyr Phe Lys	
135 140 145	
ATG GAA AAT GAT CTT CCA CAA AAA ATA CAG TGT ACT CTT AGC AAT CCA	576
Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser Asn Pro	
150 155 160	
TTA TTT AAT ACA ACA TCA TCA ATC ATT TTG ACA ACC TGT ATC CCA AGC	624
Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile Pro Ser	
165 170 175 180	
AGC GGT CAT TCA AGA CAC AGA TAT GCA CTT ATA CCC ATA CCA TTA GCA	672
Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala	
185 190 195	
GTA ATT ACA ACA TGT ATT GTG CTG TAT ATG AAT GGT ATT CTG AAA TGT	720
Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly Ile Leu Lys Cys	
200 205 210	
GAC AGA AAA CCA GAC AGA ACC AAC TCC AAT TGA	753
Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn	

配列番号: 12
配列の長さ: 32
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖

215 220
配列
TGGGGATCCA TGGTAAGTCA AGATATTAT GG 32
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: 他の核酸 合成DNA
ハイボセティカル配列: No

配列番号: 13
配列の長さ: 51
配列の型: 核酸
鎖の数: 一本鎖

配列
CAACTGCAGC TACGACGTCC CAGAAAACCT ATGCCTTGCA TAATCAATCA C 51
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: 他の核酸 合成DNA
ハイボセティカル配列: No
アンチセンス: Yes

配列番号: 14
配列の長さ: 321
配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖
トポロジー: 直鎖状
ハイボセティカル配列: No
配列
ATG GTA AGT CAA GAT ATT TAT GGA GCT ATG AAT GGG AAT GTA ACC TTT 48
Met Val Ser Gln Asp Ile Tyr Gly Ala Met Asn Gly Asn Val Thr Phe
1 5 10 15
TAC GTT TCA GAG TCT CAA CCG TTT ACA GAG ATT ATG TGG AAG AAG GGG 96
Tyr Val Ser Glu Ser Gln Pro Phe Thr Glu Ile Met Trp Lys Lys Gly
20 25 30
AAG GAT AAA GTT GTA GAA TGG GAT CAA ACA TCT GGA CTC GAA GCT TTT 144
Lys Asp Lys Val Val Glu Trp Asp Gln Thr Ser Gly Leu Glu Ala Phe
35 40 45
CAG TCT TTT AAA AAT AGA GTT CAT TTA GAC ATT GTG TCA GGT AAC CTC 192
Gln Ser Phe Lys Asn Arg Val His Leu Asp Ile Val Ser Gly Asn Leu
50 55 60
ACC ATC ACC GGG TTA ACA AAA TTA GAT GAA GAT GTG TAT GAA ATT GAA 240
Thr Ile Thr Gly Leu Thr Lys Leu Asp Glu Asp Val Tyr Glu Ile Glu
65 70 75 80
TCC CCA AGT GTT AAA AAG AGC TCC CAG TTC CAC CTC AGA GTG ATT GAT 288
Ser Pro Ser Val Lys Lys Ser Ser Gln Phe His Leu Arg Val Ile Asp
85 90 95
TAT GCA AGG CAT AGG TTT TCT GGG ACG TCG TAG 321
Tyr Ala Arg His Arg Phe Ser Gly Thr Ser
100 105
ATC TAC AAC TTA ACA TCA TCA GAT GAA GAT GAG TAT GAA ATG GAA TCG 240
Ile Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser
65 70 75 80
CCA AAT ATT ACT GAT ACC ATG AAG TTC TTT CTT TAT GTG CTT GGT CAT 288
Pro Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Gly His
85 90 95
TCA AGA CAC AGA GAC AGA AAA CCA GAC AGA ACC AAC TCC AAT TGA 333
Ser Arg His Arg Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn
100 105 110

配列番号: 15
配列の長さ: 46
配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: Yes

配列

TTTTTGGAA CTGCAGCTAA CACGACGTCC CAGAAAACCT ATGCCT

46

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に用いるLFA-3誘導体タンパク質の担体への結合を示す図である。(a)は従来の方法にしたがいLFA-3誘導体タンパク質をアミノ基を介して担体に結合した図を示し、(b)は本発明にしたがいLFA-3誘導体タンパク質をチオール基を介して担体に結合した図を示している。図中、○は唯一のシステイン残基、白抜き三角はアミノ基に特異性をもつ分子、斜線を付した三角はアミノ基よりもチオール基に特異性をもつ活性化ハロゲン分子を示す。

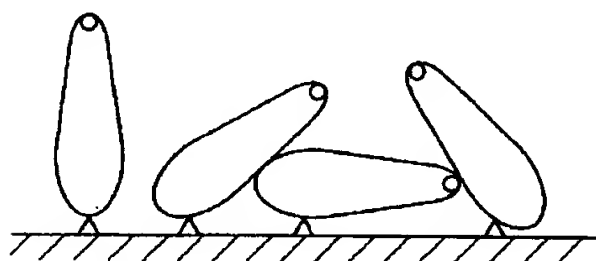
【図2】本発明の細胞付着部材および対照である2-メルカプトエタノールを固定化した部材について付着した

CD2陽性および陰性のジャーカット細胞を0.05%クリスタルバイオレットにより染色した結果を示す図である。

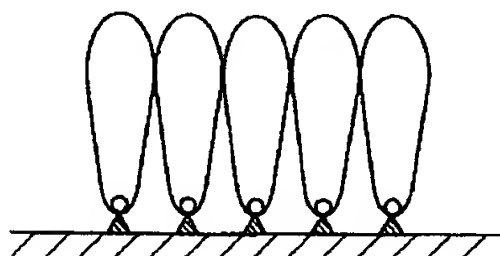
【図3】プレートに付着されたCD2およびCD3陽性のジャーカット細胞、またはCD2およびCD3陰性のジャーカット細胞を0.05%クリスタルバイオレットにより染色した結果を示す図である。LFA-3誘導体タンパク質がチオール基を介して結合されたプレート、CD3抗体がアミノ基を介して結合されたプレートおよびBSAがアミノ基を介して結合されたプレートを用いたばあいの結果をそれぞれ示す。

【図1】

(a)



(b)



【図2】

	LFA-3誘導体 タンパク質	2-メルカプトエタ ノール (対照)
CD2 陽性細胞		
CD2 陰性細胞		

【図3】

	CD2 ⁺ およびCD3 ⁺ ジャーカット細胞	CD2 ⁻ およびCD3 ⁻ ジャーカット細胞
LFA-3 誘導体固定化プレート		
CD3抗体 固定化プレート		
BSA 固定化プレート		

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
// B01D 15/08

識別記号

庁内整理番号

FI

C12N 5/00

技術表示箇所

E